

CHROM. 12,187

GASCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG UNPOLARER UND OXIDIERTER STERINE

ELFRIEDE HOMBERG und BIRGITTA BIELEFELD

Bundesanstalt für Fettforschung, Piusallee 68-76, D-4400 Münster (B.R.D.)

(Eingegangen am 13. Juni 1979)

SUMMARY

Gas chromatographic separation of non-polar and oxidized sterols

The relative retention times of 35 non-polar and polar cholesterol derivatives with functional groups in the A/B-ring system were determined on 9 different stationary phases of various polarities. The influence of etherification and esterification of the hydroxyl groups and that of derivatisation of the keto groups were investigated. From these data it is possible to derive optimal conditions for separation and identification of these sterols.

EINLEITUNG

Über die gaschromatographische (GC) Trennung pflanzlicher Sterine mit ausführlichen Angaben über geeignete Gaschromatographen, Trägermaterialien und stationäre Phasen wurde bereits berichtet¹⁻². Die Untersuchungen erstreckten sich ausschliesslich auf 3 β -Hydroxysterioide ohne zusätzliche Hydroxy- oder Ketogruppen. Bei Raffinationsprozessen, durch Autoxidation oder durch Metabolisierung in biologischen Systemen entstehen jedoch Sterine, die entweder keine polaren Gruppen mehr aufweisen oder zusätzliche Hydroxy- und Ketogruppen haben. Diese Substanzen zeichnen sich durch ein völlig anderes chromatographisches Verhalten aus als die in ihrer Polarität relativ einheitlichen pflanzlichen Sterine.

Gaschromatographisch wurden diese Produkte bisher nur selten untersucht³⁻⁸. Die Trennungen wurden durchgeführt auf stationären Phasen unterschiedlicher Polarität, wobei sich vor allem Trifluorpropylsiloxan (QF-1) als spezifisch für Ketogruppen herausgestellt hat. Eine Derivatisierung der Ketosterine zu N,N-Dimethylhydrazonen⁹, O-Methyloximen^{10,11} oder Äthylthioketalen¹² beschränkte sich auf die Untersuchung von Steroidhormonen. Die Hydroxysterioide wurden vorwiegend als TMS-Äther gaschromatographisch untersucht, gelegentlich auch als Acetate oder Trifluoracetate. Das vorhandene Untersuchungsmaterial reicht jedoch nicht aus, um daraus Gesetzmässigkeiten und spezifische Trennmöglichkeiten auf geeigneten stationären Phasen abzuleiten. Deshalb wurden GC Untersuchungen an polaren und unpolaren Cholestanderivaten durchgeführt, um den Einfluss von Anzahl und

Stellung von Doppelbindungen, Hydroxy- und Ketogruppen auf das Retentionsverhalten festzustellen. Die relativen Retentionszeiten der wichtigsten Derivate des Cholesterins, die bei der Oxidation des A/B-Ringsystems entstehen, sowie eine Reihe unpolarer Sterine wurden auf 9 verschiedenen stationären Phasen unterschiedlicher Polarität untersucht.

EXPERIMENTELLES

GC-Säulen und Arbeitsbedingungen

Die GC Bedingungen waren die gleichen wie bei der Untersuchung der pflanzlichen Sterine². Neben den dort verwandten 8 verschiedenen stationären Phasen wurden in dieser Arbeit alle Substanzen auch auf 3.8% UCCW-982 (Vinyl-methylsilikon) getestet; Trägermaterial Diatoport S, 80–100 mesh, Arbeitstemperatur 265°. Alle in den Tabellen I–III angegebenen Retentionszeiten sind bezogen auf Cholestan = 1.00 bei einer absoluten Retentionszeit von 15 min für Cholestan.

Die Derivatisierung der Hydroxysterine zu TMS-Äthern wurde durchgeführt mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-heptafluor(o)butyramid(e) (MSHFBA)². Zur Herstellung der O-Methyloxime wurden 2 mg Substanz in 0.2 ml Pyridin gelöst, ein Überschuss an Methoxyl-amin-Hydrochlorid zugegeben und das Gemisch 1 h in "reaction vials" auf 100° erhitzt. Dann wurde im N₂-Strom bis zur Trockene eingedampft und das O-Methyloxim in wenig Benzol gelöst.

Standardsubstanzen

Cholestan, Cholestanol, Cholesterin, Δ 4-Cholesten-3-on, Cholesterinacetat und Cholesterinpalmitat waren handelsübliche Produkte der Firma Fluka (Neu-Ulm, B.R.D.). Für die Überlassung von Δ 5-Cholesten, Δ 7-Cholesten, Δ 5,7-Cholestadien, Cholestan-7 β -ol, Δ 4-Cholesten-7 β -ol und Cholestan-7-on sind wir Herrn Dr. Schiller zu Dank verpflichtet. Δ 1-Cholesten¹³, Δ 4-Cholesten¹⁴, Δ 4,6-Cholestadien¹⁵, Cholestan-3 β , 6 α -diol¹⁶, Cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol und Cholestan-3 β , 5 α -diol-6-on¹⁷, Δ 5-Cholesten-3 β , 7 β -diol¹⁸, Cholestan-3-on¹⁹ und Δ 5-Cholesten-7-on²⁰ wurden synthetisiert, Δ 5-Cholesten-7 β -ol hergestellt aus Δ 5-Cholesten-7-on durch Reduktion mit LiAlH₄. Über die Synthese der übrigen Sterine wurde bereits früher berichtet⁸.

RESULTATE UND DISKUSSION

Charakterisierung der stationären Phasen

Für die Untersuchung polarer Cholesterinderivate sind sowohl die Polarität der Trennsäule als auch die Selektivität der stationären Phase gegenüber bestimmten polaren Gruppen von grosser Bedeutung. Trotz gleicher oder ähnlicher McReynolds Konstanten wurden teilweise grosse Unterschiede im Retentionsverhalten festgestellt, die auf der Selektivität einer stationären Phase gegenüber bestimmten polaren Gruppen beruhen. Von den hier verwandten Trennsäulen weisen Dexsil 300, QF-1 und Silar 5CP eine solche Selektivität gegenüber Ketogruppen und eine besonders starke Beeinflussung durch eine der Ketogruppe benachbarte Doppelbindung auf. Gegenüber anderen polaren Gruppen sind sie mit Säulen ähnlicher Polarität vergleichbar, ohne Rücksicht auf die chemische Zusammensetzung der stationären Phase. SP-1000

hat gegenüber anderen hoch polaren Säulen eine grössere Selektivität für OH-Gruppen. Die Retention von Doppelbindungen, OH- und CO-Gruppen ist auf polaren Phasen grösser als auf unpolaren. Doppelbindungen bewirken die geringsten Retentionsveränderungen, Ketogruppen die grössten. Die Differenzen zwischen diesen verschiedenen polaren Gruppen sind auf polaren Phasen besonders stark ausgeprägt. Auf allen Säulen sind Keto- und Hydroxygruppen in 3-Stellung polarer als in 7-Stellung, konjugierte Diene werden später eluiert als Monoene; Diene mit isolierten Doppelbindungen verhalten sich ähnlich wie Monoene. Acetate sind polarer als TMS-Äther. Die Äther haben auf unpolaren stationären Phasen längere, auf polaren kürzere Retentionszeiten als die entsprechenden freien Sterine. Sterinester langkettiger Fettsäuren sowie die unpolaren, hoch molekularen Bisteroide und Dicholesteryläther werden überhaupt nicht eluiert.

Zwischen den beiden unpolaren stationären Phasen UCCW-982 und SE-30 bestehen nur geringe graduelle Unterschiede. Die Polarität ist die gleiche; auf UCCW-982 liegen die relativen Retentionszeiten jedoch durchweg etwas niedriger als auf SE-30. Dexsil 300, ebenfalls unpolar, hat dagegen völlig andere Retenzeigenschaften. Auf ihr lassen sich nur unpolare Sterine, Ketosterine und Sterin-TMS-Äther untersuchen. Sterine mit freien OH-Gruppen sowie Acetate werden auf älteren Dexsil-Säulen nicht mehr eluiert. Diese Säule unterscheidet sich von den anderen unpolaren Säulen durch ihre bedeutend grössere Selektivität gegenüber Ketogruppen. Eine Kombination von SE-30 und Dexsil 300 ist daher zum Nachweis von Keto- und Hydroxygruppen im Sterinmolekül geeignet, da auf Dexsil 300 die Ketosterine bedeutend längere Retentionszeiten haben und Hydroxysterine nicht eluiert werden. Gegenüber unpolaren Sterinen verhalten sich die beiden stationären Phasen gleich.

OV-17 und OV-25 stehen in ihrer Polarität zwischen UCCW-982, SE-30 und Dexsil 300 einerseits sowie HJ-EFF-8BP, Silar 5CP und SP-1000 andererseits. Sie zeigen keine spezifische Selektivität gegenüber Doppelbindungen, OH- oder C=O-Gruppen. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Polarität liegen die relativen Retentionszeiten auf OV-25 etwas höher als auf OV-17. Diese Differenz ist besonders gross bei Ketosterinen. Sind mehrere polare Gruppen im Molekül vorhanden, so resultieren daraus sehr lange Retentionszeiten, die eine Identifizierung erschweren. Die Unterscheidung von positionsisomeren Hydroxy- und Ketosterinen ist auf OV-17 und OV-25 besser als auf unpolaren Säulen.

Die höhere Polarität von HJ-EFF-8BP, Silar 5CP und SP-1000 wirkt sich vorwiegend auf die Retention der Keto- und Hydroxyverbindungen aus. Diese drei stationären Phasen haben ähnliche Trenneigenschaften in Bezug auf Doppelbindungen und OH-Gruppen. Gegenüber Ketogruppen zeichnet sich Silar 5CP durch eine spezifische Selektivität aus, so dass die Retentionszeiten der Ketosterine auf dieser Säule bedeutend länger sind als auf den beiden anderen. Zur Unterscheidung von verschiedenen Ketoverbindungen und von freien Sterinen sind alle drei Säulen ungeeignet wegen der sehr langen Retentionszeiten trotz ihrer ausgezeichneten Differenzierung zwischen positionsisomeren polaren Gruppen. Zur Unterscheidung verschiedener Doppelbindungstypen sind sie jedoch den weniger polaren stationären Phasen überlegen.

QF-1 nimmt eine Sonderstellung ein. Manche Gesetzmässigkeiten auf Grund seiner Polarität treffen für diese Säule nicht zu. In Bezug auf unpolare Sterinderivate

TABELLE I
RELATIVE RETENTIONSZEITEN VON FREIEN STERINEN

<i>McReynold Konstante</i>	17	17	47	300	119	178	148	271	319	332	
<i>Sterin</i>	<i>UCCW-982</i>	<i>SE-30</i>	<i>Dexsil</i>	<i>OV-17</i>	<i>OV-17</i>	<i>OV-25</i>	<i>QF-1</i>	<i>HI-EFF-8BP</i>	<i>Silom SCP</i>	<i>SP-1000</i>	<i>Bemerkungen</i>
Cholestan	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
$\Delta 1$ -Cholesten	0.99	0.99	0.98	1.02	1.06	1.06	1.00	1.12	1.12	1.12	
$\Delta 2$ -Cholesten	0.99	0.99	0.99	1.01	1.05	1.05	1.00	1.13	1.13	1.15	
$\Delta 4$ -Cholesten	0.96	0.97	0.96	1.01	1.04	1.04	0.95	1.05	1.06	1.07	
$\Delta 5$ -Cholesten	0.99	1.01	0.99	1.03	1.08	1.08	0.98	1.09	1.10	1.12	
$\Delta 7$ -Cholesten	1.09	1.10	1.11	1.19	1.23	1.23	1.09	1.24	1.26	1.26	
$\Delta 3,5$ -Cholestadien	1.09	1.10	1.11	1.22	1.31	1.31	1.15	1.54	1.55	1.57	
$\Delta 4,6$ -Cholestadien	1.08	1.08	1.10	1.23	1.30	1.30	1.14	1.50	1.48	1.49	
$\Delta 5,7$ -Cholestadien	1.07	1.08	1.10	1.21	1.31	1.31	1.14	1.51	1.50	1.52	
$\Delta 2,6$ -Cholestadien	0.96	0.97	0.97	1.04	1.08	1.08	0.99	1.22	1.21	1.22	
Cholestan- 3β -ol	1.79	1.83	—	2.32	2.73	2.73	2.93	5.68	6.00	6.50	
Cholestan- 7β -ol	1.61	1.66	—	2.09	2.24	2.24	2.61	4.27	4.40	4.50	
Cholestan- $3\beta,6\alpha$ -diol	2.73	2.93	—	4.55	6.00	6.00	6.38	—	—	—	
Cholestan- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol	4.31	4.52	—	—	—	—	—	—	—	—	Teilw. Zers.
$\Delta 1$ -Cholesten- 3β -ol	0.96	0.98	0.95	1.05	1.09	1.09	1.07	1.31	1.26	1.25	
$\Delta 4$ -Cholesten- 3β -ol	1.71	1.79	—	2.27	2.76	2.76	2.90	6.08	6.06	6.07	
$\Delta 5$ -Cholesten- 3β -ol	0.96	0.97	0.96	1.03	1.09	1.09	1.01	1.24	1.27	1.27	
$\Delta 4$ -Cholesten- 7β -ol	1.09	1.10	1.12	1.23	1.32	1.32	1.13	1.52	1.54	1.55	
$\Delta 5$ -Cholesten- 7β -ol	1.75	1.78	—	2.36	2.82	2.82	2.92	6.01	6.28	6.85	
$\Delta 4$ -Cholesten- $7\beta,7\beta$ -diol	1.58	1.63	—	2.08	2.32	2.32	2.18	4.46	4.39	4.67	
Cholestan- 3 -on	1.09	1.09	1.11	1.22	1.29	1.29	1.14	1.50	1.48	1.50	
Cholestan- 7 -on	1.93	1.97	2.49	2.71	3.22	3.22	5.26	6.09	7.99	5.76	Zersetzung
$\Delta 1$ -Cholesten- 3 -on	1.66	1.66	2.01	2.26	2.38	2.38	3.71	4.26	5.50	3.97	Zersetzung
$\Delta 4$ -Cholesten- 3 -on	1.99	2.04	2.67	2.87	3.44	3.44	6.26	7.02	9.52	6.87	
$\Delta 5$ -Cholesten- 3 -on	2.25	2.31	3.18	3.42	4.29	4.29	8.07	9.21	13.36	8.97	
$\Delta 7$ -Cholesten- 3 -on	2.24	2.33	3.20	3.47	4.33	4.33	8.13	9.09	13.31	8.97	
$\Delta 5$ -Cholesten- 7 -on	2.04	2.11	2.69	3.14	3.60	3.60	5.97	7.11	9.38	7.14	
$\Delta 3,5$ -Cholestadien- 7 -on	1.92	1.99	2.50	2.90	3.21	3.21	5.47	6.24	8.15	6.53	
$\Delta 5$ -Cholesten- $3\beta,7\beta$ -diol	2.07	2.10	2.89	3.38	3.89	3.89	5.77	7.82	10.35	8.06	
Cholestan- $3\beta,5\alpha$ -diol- 6 -on	2.67	3.40	—	5.03	6.83	6.83	10.30	—	—	—	
Cholesterinacetat	4.01	4.21	—	8.20	12.29	12.29	—	—	—	—	
Cholesterinpalmitat	2.39	2.47	—	2.99	3.65	3.65	4.54	5.18	5.92	5.89	
Cholesterin-TMS-Äther	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	1.90	2.00	1.76	1.83	1.91	1.91	2.01	1.90	1.92	1.94	

verhält sie sich wie eine unpolare Phase trotz einer McReynolds Konstanten, durch die sie zwischen OV-17 und OV-25 eingeordnet werden müsste. Gegenüber Hydroxysterinen verhält sie sich ähnlich wie diese beiden Säulen, gegenüber TMS-Äthern der Hydroxysterine wie eine hoch polare Säule und gegenüber Ketosterinen wie eine hoch polare Säule mit spezifischer Selektivität. Die Retentionszeiten der O-Methoximderivate entsprechen der Polarität dieser Säule.

In der Tabelle I sind die relativen Retentionszeiten von 35 unpolaren und polaren Cholesterinderivaten auf 9 verschiedenen stationären Phasen zusammengefasst.

Trenneigenschaften der Säulen gegenüber unpolaren und polaren Sterinen

Unpolare Sterinderivate. Auf unpolaren stationären Phasen wie UCCW-982, SE-30 und Dexsil 300 hat eine Doppelbindung in $\Delta 1$ - bis $\Delta 5$ -Stellung kaum einen Einfluss auf die Retentionszeit gegenüber Cholestan. Nur das $\Delta 7$ -Derivat weist eine längere Retentionszeit auf, die eine eindeutige Trennung von den anderen Monoenen des A/B-Ringsystems ermöglicht. QF-1 verhält sich in Bezug auf Doppelbindungen ähnlich wie diese unpolaren Säulen. Polare Phasen beeinflussen die Retentionszeit selektiv je nach der Stellung der Doppelbindung im Molekül. Die geringste Verlängerung erfolgt durch eine $\Delta 4$ -Doppelbindung, die grösste durch eine Doppelbindung in $\Delta 7$ -Stellung. Auf sehr polaren Phasen wie HJ-EFF-8BP, Silar 5CP und SP-1000 ist bereits eine gewisse Differenzierung zwischen $\Delta 1$ -, $\Delta 4$ - und $\Delta 5$ -Cholesten möglich. Eine zusätzliche Doppelbindung führt auf polaren Phasen zu einer deutlichen Verlängerung der Retentionszeit, so dass eine Unterscheidung zwischen Monoenen und Dienen gut möglich ist. Bei nicht konjugierten Dienen ist diese Verlängerung geringer als bei konjugierten. Die verschiedenen konjugierten Diene des A/B-Ringsystems lassen sich auch auf polaren Säulen nicht eindeutig unterscheiden.

Hydroxysterine. OH-Gruppen kommen bei den Oxidationsprodukten des Cholesterins vorwiegend in 3,6- oder 7-Stellung vor. Eine Untersuchung dieser Gruppe ist auf allen polaren und unpolaren stationären Phasen mit Ausnahme von Dexsil 300 möglich, wenn auch die Retentionszeiten auf hoch polaren Säulen sehr lang sind. Die 3β -OH-Gruppe ist polarer als die 7β -OH-Gruppe, eine OH-Gruppe in β -Stellung polarer als in α -Stellung. Die Unterscheidung ist durchweg auf hoch polaren Säulen besser als auf unpolaren. Cholestanole sind bei der GC Untersuchung stabil, während einige Cholestenole zersetzt werden. Die Zersetzung betrifft vor allem Sterine, bei denen OH-Gruppe und Doppelbindung in Konjugation stehen. Beim $\Delta 1$ -Cholesten- 3β -ol, das schon als feste Substanz recht instabil ist, findet man bei der GC Untersuchung meist mehr oder weniger grosse Anteile an unpolaren Zersetzungsprodukten, während $\Delta 4$ -Cholesten- 3β -ol, $\Delta 5$ -Cholesten- 7β -ol und $\Delta 5$ -Cholesten- $3\beta,7\beta$ -diol vollständig zersetzt werden. Aus dem $\Delta 4$ -Cholesten- 3β -ol entstehen Mono- und Diene, aus $\Delta 5$ -Cholesten- 3β -ol das $\Delta 5,7$ -Cholestadien und aus dem Diol ebenfalls Diene. Cholestenole, die nicht zersetzt werden, lassen sich von den entsprechenden gesättigten Sterinen nur auf hoch polaren Säulen unterscheiden, am besten auf SP-1000. Cholestanole mit mehr als einer OH-Gruppe haben sehr lange Retentionszeiten und werden deshalb besser auf unpolaren Säulen untersucht.

Durch Verätherung der OH-Gruppe werden Unterschiede in der Polarität der Sterine auf den verschiedenen stationären Phasen weitgehend aufgehoben. Sie

TABELLE II
RELATIVE RETENTIONSZEITEN VON STERIN-TMS-ÄTHERN

<i>Sterin</i>	<i>UCCW-982</i>	<i>SE-30</i>	<i>Dexsil 300</i>	<i>OV-17</i>	<i>OV-25</i>	<i>QF-1</i>	<i>HI-EFF-8BP</i>	<i>Silar 5CP</i>	<i>SP-1000</i>	<i>Bemerkungen</i>
Cholestan	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Cholestan-3 β -ol	1,94	2,05	1,95	1,87	1,81	2,11	1,91	1,93	1,92	
Cholestan-7 β -ol	1,49	1,58	1,45	1,34	1,30	1,49	1,28	1,29	1,28	
Cholestan-3 β ,6 α -diol	3,05	3,31	2,16	3,40	3,88	4,50	—	8,82	—	
Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol	3,11	3,73	3,05	3,05	2,98	4,12	4,45	4,46	5,07	Triäther 3,6-Diäther
	4,13	5,01	—	6,15	7,23	7,53	—	—	—	
Δ 1-Cholesten-3 β -ol	1,93	2,05	1,85	1,92	1,83	2,04	1,95	1,94	1,95	
Δ 4-Cholesten-3 β -ol	0,95	0,95	0,97	1,05	1,09	1,05	1,25	1,27	1,27	Zersetzung
	1,08	1,10	1,13	1,24	1,32	1,17	1,55	1,50	1,55	
Δ 5-Cholesten-3 β -ol	1,90	2,00	1,76	1,83	1,91	2,01	1,90	1,92	1,95	
Δ 4-Cholesten-7 β -ol	1,42	1,54	1,38	1,32	1,32	1,37	1,32	1,28	1,33	
Δ 5-Cholesten-7 β -ol	1,08	1,09	1,11	1,21	1,29	1,14	1,52	1,50	1,52	Zersetzung
Δ 5-Cholesten-3 β ,7 β -diol	1,04	1,05	1,07	1,20	1,30	1,23	1,20	1,30	1,42	Zersetzung
						1,89	1,71	1,70	1,70	
						2,25	1,91	1,94	2,02	
						2,59	2,05	2,11	2,31	
Δ 5-Cholesten-3 β -ol-7-on	3,02	3,27	3,53	3,42	3,71	7,40	—	9,92	—	
Cholestan-3 β ,5 α -diol-6-on	3,90	4,57	5,57	5,84	7,10	11,00	—	—	—	

führt auf unpolaren Säulen zu einer Verlängerung, auf polaren Säulen zu einer Verkürzung der relativen Retentionszeit. Hydroxysterine, die sich in freier Form nicht ohne Zersetzung gaschromatographisch untersuchen lassen, sind auch als TMS-Äther nur wenig beständiger. Nur beim $\Delta 11$ -Cholesten- 3β -ol ist der Anteil an unpolaren Produkten nur sehr gering. $\Delta 4$ -Cholesten- 3β -ol und $\Delta 5$ -Cholesten- 7β -ol zersetzen sich als Äther in der gleichen Weise wie die freien Sterine. Beim $\Delta 5$ -Cholesten- 3β , 7β -diol werden auf unpolaren Säulen sowie auf OV-17 und OV-25 nur unpolare Diene erhalten. Auf hoch polaren Säulen und QF-1 werden jeweils 4 Peaks nachgewiesen, wobei es sich bei dem Hauptpeak mit der längsten Retentionszeit um den unzersetzten Diäther handeln könnte. Die TMS-Äther von Cholestanderivaten mit mehreren OH-Gruppen sind stabil. Bei der Verätherung des Cholestan- 3β , 5α , 6β -triols entsteht ein Gemisch aus dem 3,6-Diäther und dem Triäther²¹. Je nach Reaktionsbedingungen bei der Herstellung der Äther kann die vollständige oder die teilweise verätherte Verbindung überwiegen. Sterine mit Hydroxy- und Ketogruppen haben auch nach der Verätherung der OH-Gruppe noch so lange Retentionszeiten, dass sie auf hoch polaren Säulen nicht mehr untersucht werden können. Zur Trennung isomerer 5α - und 5β -Cholestanole²² sowie der isomeren 5α -Cholestanole mit OH-Gruppen in 1-, 2-, 3- und 7-Stellung auf hoch polaren stationären Phasen ist eine Verätherung jedoch vorteilhaft.⁶

Auf unpolaren Säulen werden Hydroxysterine besser in freier Form untersucht, auf polaren ist eine Derivatisierung zu TMS-Äthern wegen der verkürzten Retentionszeiten vorteilhaft. Hydroxysterine, die sich im Gaschromatographen zersetzen, sind mit Ausnahme von $\Delta 11$ -Cholesten- 3β -ol auch als TMS-Äther nicht beständig. Cholestan- 3β , 5α , 6β -triol ist zwar auf polaren Säulen als Äther zu untersuchen, wenn auch durch die Bildung des Gemisches aus Di- und Triäther eine quantitative Bestimmung erschwert wird.

In der Tabelle II sind die auf 9 verschiedenen stationären Phasen ermittelten relativen Retentionszeiten der als TMS-Äther untersuchten Hydroxysterine zusammengestellt.

Acetylierung der 3β -OH-Gruppe führt auf den meisten Säulen zu einer Verlängerung, auf hoch polaren Phasen jedoch zu einer Verkürzung der Retentionszeit. Ester langkettiger Fettsäuren sowie Cholesteryläther und Bisteroide werden wegen ihres hohen Molekulargewichts unter den gegebenen Bedingungen auf allen Säulen nicht mehr eluiert.

Ketosterine. Unter den Oxidationsprodukten des Cholesterins sind auch Ketosterine zu finden, wobei die C=O-Gruppe bevorzugt in 3- oder 7-Stellung steht. Auf allen stationären Phasen verhalten sich Ketogruppen polarer als Hydroxygruppen; eine C=O-Gruppe in 3-Stellung ist bedeutend polarer als in 7-Stellung. Durch eine zusätzliche Doppelbindung wird die Retentionszeit verlängert. Sie ist am grössten bei Konjugation und wird geringer, je weiter die Ketogruppe von der Doppelbindung entfernt ist. Zusätzliche OH-Gruppen führen zu einem starken Polaritätsanstieg. Da jedoch schon eine einzige Ketogruppe im Molekül auf hoch polaren Säulen eine so starke Verlängerung der Retentionszeit bewirken kann, dass eine GC Untersuchung nicht mehr sinnvoll ist, können auf diesen Säulen Sterine mit mehreren polaren Gruppen nicht untersucht werden. Deshalb sind auch QF-1 und Silar 5CP trotz ihrer Selektivität für Ketogruppen zur Untersuchung dieser Substanzklasse ungeeignet. Bei Dexsil 300, das ebenfalls spezifisch auf C=O-Gruppen

reagiert, halten sich dagegen die Retentionszeiten auch von Sterinen mit mehreren polaren Gruppen in vertretbaren Grenzen. Im allgemeinen reichen unpolare Säulen zur Untersuchung von Ketosterinen aus. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen Δ^4 und Δ^5 -Cholesten-3-on ist auf keiner stationären Phase möglich. Zersetzungen wurden bei der gaschromatographischen Untersuchung der Ketosterine nicht beobachtet.

Aus Ketosterinen lassen sich ähnlich wie bei den Hydroxysterinen Derivate mit veränderten chromatographischen Eigenschaften herstellen. Bewährt haben sich die O-Methyloxime. Sterine mit Ketogruppen in 3- und 7-Stellung sind als O-Methyloxime gaschromatographisch ebenso stabil wie die freien Ketone. Die Herstellung ist problemlos, die Haltbarkeit jedoch ähnlich wie bei den TMS-Äthern nur begrenzt. Oximbildung führt nur zu einer geringen Molekülvergrößerung, aber zu einer starken Abnahme der Polarität der Ketosterine. Auf Grund der charakteristischen Eigenschaften der stationären Phasen haben die Oxime im allgemeinen auf unpolaren Säulen längere, auf polaren Säulen kürzere Retentionszeiten als die entsprechenden freien Sterine. Die Differenzen sind besonders gross bei Säulen, die eine spezifische Adsorption für Ketogruppen aufweisen. Die Retentionszeit der Oxime wird sowohl durch die Polarität der Säule als auch durch die Position der Ketogruppe sowie Zahl und Stellung zusätzlicher OH-Gruppen und Doppelbindungen beeinflusst, so dass auch auf unpolaren Säulen eine Verkürzung, auf polaren eine Verlängerung der Retentionszeit durch Oximbildung erfolgen kann. Oxime mit einer Ketogruppe in 3-Stellung haben immer längere Retentionszeiten als in 7-Stellung.

Bei der Reaktion von O-Methylamin mit Steroidketonen kann es zur Bildung von 2 isomeren Derivaten kommen²³. Dieser Effekt ist im allgemeinen nicht erwünscht, wenn sich die Isomeren chromatographisch trennen lassen. Die isomeren O-Methyloxime der 3-Ketosterine liessen sich auf SE-30, OV-25, QF-1 und Silar 5CP trennen, nicht auf Dexsil 300, Bei den 7-Ketosterinen wurden keine isomeren O-Methyloxime nachgewiesen. 3β , 5α -Dihydroxycholestan-6-on bildet kein O-Methyloxim.

Im allgemeinen wirkt sich die Oximbildung durch Aufhebung der Polarität der Ketogruppe dahingehend aus, dass eine Unterscheidung zwischen den im Molekül vorhandenen Doppelbindungen verschlechtert wird oder kaum noch möglich ist, wie z.B. bei QF-1. Auch der Vorteil einer bedeutend verkürzten Retentionszeit gegenüber den freien Sterinen auf polaren Säulen ist nicht ausschlaggebend, da mit Dexsil 300 eine Säule zur Verfügung steht, auf der auch freie Ketosterine einwandfrei untersucht werden können. Im Zweifelsfall kann durch Oximbildung jedoch geklärt werden, ob ein Ketosterin vorliegt.

In der Tabelle III sind die auf 5 verschiedenen stationären Phasen ermittelten relativen Retentionszeiten der als O-Methyloxime untersuchten Ketosterine zusammengestellt.

Bei Sterinen, die Keto- und Hydroxygruppen enthalten, ist die Herstellung von O-Methoxim-trimethylsilyläthern möglich^{10,24,25}.

Auch die N,N-Dimethylhydrazone der Ketosterine wurden untersucht. Sie haben ein etwas höheres Molekulargewicht als die O-Methyloxime und können ebenfalls Isomere bilden. Bei Fales und Luukkainen¹¹ finden sich jedoch Hinweise auf mögliche Zersetzungsprodukte. N,N-Dimethylhydrazone weisen gegenüber den entsprechenden O-Methyloximen der Ketosterine keine Vorteile bei der GC Untersuchung auf.

TABELLE III

RELATIVE RETENTIONSZEITEN DER O-METHYLOXIME VON KETOSTERINEN

<i>Sterin</i>	<i>SE-30</i>	<i>Dexsil 300</i>	<i>OV-25</i>	<i>QF-1</i>	<i>Silar 5CP</i>	<i>Bemerkungen</i>
Cholestan	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Cholestan-3-on	2.30	2.73	3.28	2.77	4.58	
Cholestan-7-on	1.84	2.12	2.63	1.71	2.64	
11-Cholesten-3-on	2.33	2.37	3.29	2.80	4.80	
14-Cholesten-3-on	2.47	2.82	3.65	3.21	5.60	
15-Cholesten-3-on	2.51	2.70	3.64	3.19	5.67	
17-Cholesten-3-on	2.49	2.89	3.48	2.86	5.45	
15-Cholesten-7-on	1.97	2.70	3.00	2.22	3.87	
13,5-Cholestadien-7-on	2.15	2.91	3.59	2.51	4.75	
15-Cholesten-3 β -ol-7-on	3.04	—	6.01	4.81	—	
Cholestan-3 β ,5 α -diol-6-on	—	—	—	—	—	Keine Oximbildung

ZUSAMMENFASSUNG

Die relativen Retentionszeiten von 35 unpolaren und polaren Cholesterinderivaten mit funktionellen Gruppen im A/B-Ringsystem wurden auf 9 verschiedenen stationären Phasen unterschiedlicher Polarität bestimmt. Auch der Einfluss einer Verätherung oder Veresterung der Hydroxygruppen bzw. einer Derivatisierung der Ketogruppen wurde untersucht. Aus den so ermittelten Werten lassen sich optimale Bedingungen zur Trennung und Identifizierung dieser Sterine ableiten.

LITERATUR

- 1 E. Homberg, *Fette-Seifen-Anstrichm.*, 79 (1977) 234.
- 2 E. Homberg, *J. Chromatogr.*, 139 (1977) 77.
- 3 J. R. Claude, *J. Chromatogr.*, 23 (1966) 267.
- 4 J. R. Claude und J. L. Beaumont, *J. Chromatogr.*, 21 (1966) 189.
- 5 J. A. Fioriti und R. J. Sims, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 44 (1967) 221.
- 6 J. E. Herz und E. González, *J. Chromatogr.*, 34 (1968) 251.
- 7 J. I. Teng, M. J. Kulig und L. L. Smith, *J. Chromatogr.*, 75 (1973) 108.
- 8 E. Homberg, *Fette-Seifen-Anstrichm.*, 77 (1975) 8.
- 9 W. J. A. VandenHeuvel und E. C. Horning, *Biochim. Biophys. Acta*, 74 (1963) 560.
- 10 W. L. Gardiner und E. C. Horning, *Biochim. Biophys. Acta*, 115 (1966) 524.
- 11 H. M. Fales und T. Luukkainen, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 955.
- 12 A. Zmigrod und H. R. Lindner, *Steroids*, 8 (1966) 119.
- 13 H. B. Henbest und R. A. L. Wilson, *J. Chem. Soc.*, (1956) 3289.
- 14 H. Hauptmann, *J. Amer. Chem. Soc.*, 69 (1947) 562.
- 15 J. C. Eck, L. van Peurseem und E. W. Hollingsworth, *J. Amer. Chem. Soc.*, 61 (1939) 171.
- 16 Pl. A. Plattner, H. Heusser und M. Fleurer, *Helv. Chim. Acta*, 32 (1949) 587.
- 17 L. F. Fieser und S. Rajagopalan, *J. Amer. Chem. Soc.*, 71 (1949) 3938.
- 18 L. F. Fieser, M. Fieser und R. N. Chakravarti, *J. Amer. Chem. Soc.*, 71 (1949) 2226.
- 19 A. H. Blatt (Editor), *Org. Synth. Coll. Vol. I*, Wiley, New York, 1943, S. 139.
- 20 A. Windaus, *Ber.*, 53 (1920) 488.
- 21 C. J. W. Brooks und J. Watson, *J. Chromatogr.*, 31 (1967) 396.
- 22 R. G. Mathews, R. D. Schwartz, C. D. Pfaffenberger, Shen Nan Liu und E. C. Horning, *J. Chromatogr.*, 99 (1974) 51.
- 23 M. G. Horning, A. M. Moss und E. C. Horning, *Anal. Biochem.*, 22 (1968) 284.
- 24 E. M. Chambaz, G. Maume, B. Maume und E. C. Horning, *Anal. Lett.*, 1 (1968) 749.
- 25 G. Gaidano, G. Molino, A. Angeli, L. Perotti und G. Boccuzzi, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 44 (1968) 40.